

Calciprotein particle (CPP)とオートファジーに着目した、マグネシウムによる腎不全進行抑制の機序解明

山本 毅士

大阪大学大学院医学系研究科腎臓内科学

概要 齢化や生活習慣病の増加に伴い、慢性腎臓病(CKD)および透析患者数は年々増加し、医療的にも社会的にもその対策が急務である。高リン(P)血症は血管石灰化の促進因子であり、その健康被害は CKD 患者において長年問題視されてきた。高 P 食負荷で腎尿細管からの P 排泄を増加させると、腎尿細管内に微細なリン酸カルシウム結晶 Calciprotein particle (CPP)が生じ、尿細管を障害することが報告され注目を浴びている。一方、マグネシウム(Mg)摂食が CKD や心疾患のリスクを下げるという疫学調査があるが、その機序や根拠は明確ではない。

オートファジーは細胞内の主な分解機構であり、細胞内恒常性維持の役割を担う。筆者は老化・肥満・糖尿病等の生活習慣病が腎尿細管オートファジーに与える影響とその役割を研究し、特に高 P 負荷ではオートファジーがミトコンドリア品質管理を介して腎を保護する一方、高 P はオートファジー後期段階の障害を起こし、その保護作用を打ち消すことを見出した。

本研究では「Mg は、①病原体 CPP の抑制と、②生体防御機構オートファジーの活性上昇により、高 P 腎毒性を解除できる」という仮説をたて、P-Mg バランスが CPP 形成やオートファジーに及ぼす影響を解明し、CPP 形成抑制因子やオートファジー不全を解消する分子を模索し、食を通じて腎保護・健康維持につなげることを目的とした。

その結果、①高リン負荷により、次第にオートファゴソームとリソソームの融合不全を生じること、②高リン負荷は、腎臓・肝臓において Rubicon の蛋白発現が増加すること、③高リン負荷による腎障害は Rubicon 欠損により改善する、④高リン低マグネシウム食は、腎における Rubicon を著増させ、オートファジー不全を起こすが、マグネシウム補充により改善することを見出した。本研究は、CPP と Rubicon を中心に捉え高 P 毒性(老化腎・CKD・炎症を加速させる)を解明し、それに基づき Mg の有効性の確立・提唱まで視野に入れた「食生活と健康」に直結した課題であり、急務である CKD 対策に新たな視点と可能性を提供する。

1. 研究目的

日本人が健康長寿である理由は『伝統的日本食』に起因すると考えられ、その特徴として大豆や魚・海藻、野菜・きのこ、発酵食品等を多く摂取することがあげられる。一方、欧米化の影響を受け、生活習慣病の増加が問題となっている。中でも近年、『超加工食品』による健康被害が危惧されている。例えば超加工食品を食べると 1 日 500 kcal を多く摂取し最小加工食品に比べ食べるスピードが速く体重・死亡リスクが増加する^(1, 2)。

いったいどのように『伝統的日本食』は長寿をもたらし、逆に『超加工食品』は老化を進めてしまうのだろうか。『超加工食品』中の無機リンはほぼすべて吸収され、特に慢性腎臓病(CKD)患者では、リン濃度上昇は死亡、心血管疾患・血管石灰化だけでなく腎不全進行とも関連するため、過剰なリン摂取は予後に関わる深刻な問題である。一方、食品加工過程でマグネシウムが失われる。本邦ではマグネシウム摂取量が経年的に減少し、その平均摂取量は推奨量に達していない。したがって、『伝統的日本食』は『マ

グネシウムを豊富に含む食事』であり、『超加工食品』は『マグネシウムが欠乏した高リン食』と言える。

このリンとマグネシウムのアンバランスが生体に及ぼす影響として筆者らは高リン食により惹起される腎不全マウスの腎尿細管障害・線維化が低マグネシウム食によって増悪すること⁽³⁾、またリンが高くマグネシウムが低い CKD 患者では腎不全進行リスクが高い、すなわちリン毒性がマグネシウム欠乏によって助長されること⁽⁴⁾を観察しているが、その詳細な分子学・細胞学的機序は明らかでない。

大隅良典氏がノーベル賞を受賞されたことで有名になった、オートファジーは主要な細胞成分分解機構の一つで細胞恒常性維持に働き疾患に対抗する⁽⁵⁾。筆者らの検討により、腎臓においては老化や肥満・糖尿病でオートファジーの役割がより重要になるにもかかわらず次第に停滞し疾患に十分対抗できないことが判明している⁽⁶⁻⁹⁾。筆者らはオートファジーを本来体に備わっている生体防御機構と捉え、食を通じオートファジー調節を行うことこそが健康長寿の秘訣と考えている。その観点から最近、オートファジー障害を解除する成分を探し魚に多く含まれる EPA がオートファジーを回復し脂肪毒性を軽減することを見出した⁽¹⁰⁾。

以上より本研究では、2つのミネラルに着目し、マグネシウムはオートファジーを介してリン腎毒性を軽減するとの仮説をたて、①リンがオートファジーに及ぼす影響(特にオートファジー抑制因子 Rubicon に着目し)を解明し、②食(マグネシウム)とオートファジー改善を通じ健康を維持することを目的とし研究を行った。

2. 研究方法

2.1 マウス

近位尿細管特異的 Atg5 あるいは Rubicon ノックアウトマウスは、筆者らが以前に作製した^(6, 11, 12)。コントロールマウスはそれぞれ対照となる Atg5 flox, Rubicon flox, 野生型相当のマウスを使用した。雄マウスのみを被験動物として使用した。マウスには水と標準的なマウス用餌(リン・マグネシウムの負荷試験を除く)を自由に摂食させた。それぞれの研究目的に合わせた処置あるいは負荷を行ったマウスを麻酔下で解剖し、採血・採尿を行った。PBS (pH7.4) でマウスを経心的に灌流し腎臓を採取した。摘出した腎臓をスライスし、4%PFA(パラホルムアルデヒド)で後固定し、パラフィンに包埋するか、OCT コンパウンドで凍結し、切

片試料とした。切片試料を PAS (Periodic acid-Schiff) 染色し、光学顕微鏡で観察した。

2.2 マウスにおけるオートファジー活性の測定

オートファジー研究が急速な発展を遂げている一方で、生体内オートファジーモニター法にはまだ課題が多く、オートファゴソーム数や LC3-II 増加は無条件にオートファジー活性化を示しているわけではなく、オートファジーとリソソームの融合不全やリソソーム機能障害といった後期段階のブロックを示している可能性もある。筆者らはこの注意点をクリアし、マウスに対して解剖の6時間前にリソソーム阻害薬であるクロロキンを投与し、投与ありと投与なしの LC3-II の差を評価する方法を用い、マウス *in vivo* オートファジーフラックスアッセイを確立した⁽⁶⁾。本研究では、この評価方法を用いてマウスのオートファジー活性を評価した。

2.3 免疫染色・ウエスタンブロットング・抗体

/統計解析

通常に行われる実験方法および統計解析については、当研究室における従来通りの方法を用いた^(6, 7, 12, 13)。

3. 研究結果

3.1 高リン負荷がオートファジーリソソーム系に及ぼす影響の検討

オートファジーは、自己の細胞質構成成分(タンパク、脂質、細胞内小器官など)をリソソーム内で分解するシステムである。飢餓時や細胞内小器官が傷害を受けた場合、分解されるべき物質を包み込むように膜が取り囲む(オートファゴソーム)。オートファゴソームはリソソームと融合し(オートリソソーム)、リソソームの加水分解酵素群により内包物が分解され、分解産物は細胞に必要なタンパク合成やエネルギー源として再利用される。オートファジーは、飢餓や種々のストレスに応じて活性化され、飢餓応答や細胞内恒常性維持などを通じて、様々な病態に対抗することが明らかとなっている⁽⁵⁾。

一方、CKD 患者において高リン血症は頻度の高い合併症であり、総死亡および心血管疾患発症の独立した危険因子である。さらに CKD 進行に伴い腎尿細管におけるリン負荷が増大し、さらなる腎障害進展に寄与する。以上より、筆者らは、CKD における高リン腎毒性に着目し、片腎摘 高リン負荷 CKD モデルマウスの解析を開始した。まず、近位尿細管のオートファジー(特に、傷害ミトコンドリアを除去するマイトファジー)が亢進しミトコンドリア品質管

理を介して腎保護に働くことを報告した⁽¹³⁾。続いて、筆者らが樹立した野生型近位尿細管培養細胞に、リン負荷 (2.5 mM) を行い、オートファジー活性 (LC3-II) を検討したところ、オートファジーはいったん活性化するものの、長時間のリン負荷ではその活性が消失することが判明した。免疫染色を用いた評価により、長時間リン負荷にさらされた培養細胞では、次第にオートファジー後期段階のオートファゴソームとリソソームの融合不全を起こしてしまうことを見出した (Fig. 1)。

3. 2 高リン負荷による Rubicon の増加と Rubicon ノックアウトによる改善

共同研究者である吉森保教授らは、これまでに、オートファゴソームとリソソームの融合抑制を通じてオートファジーを負に制御する因子 Rubicon を同定している⁽¹⁴⁾。そのため、高リン負荷時のオートファゴソーム-リソソーム融合不全における Rubicon の関与に着目した。高リン負荷により腎臓や肝臓において Rubicon のタンパク発現量が増加しオートファジー不全が生じた。近位尿細管特異的に Rubicon をノックアウトすると高リン負荷による腎尿細管障害が改善した (Fig. 2)。

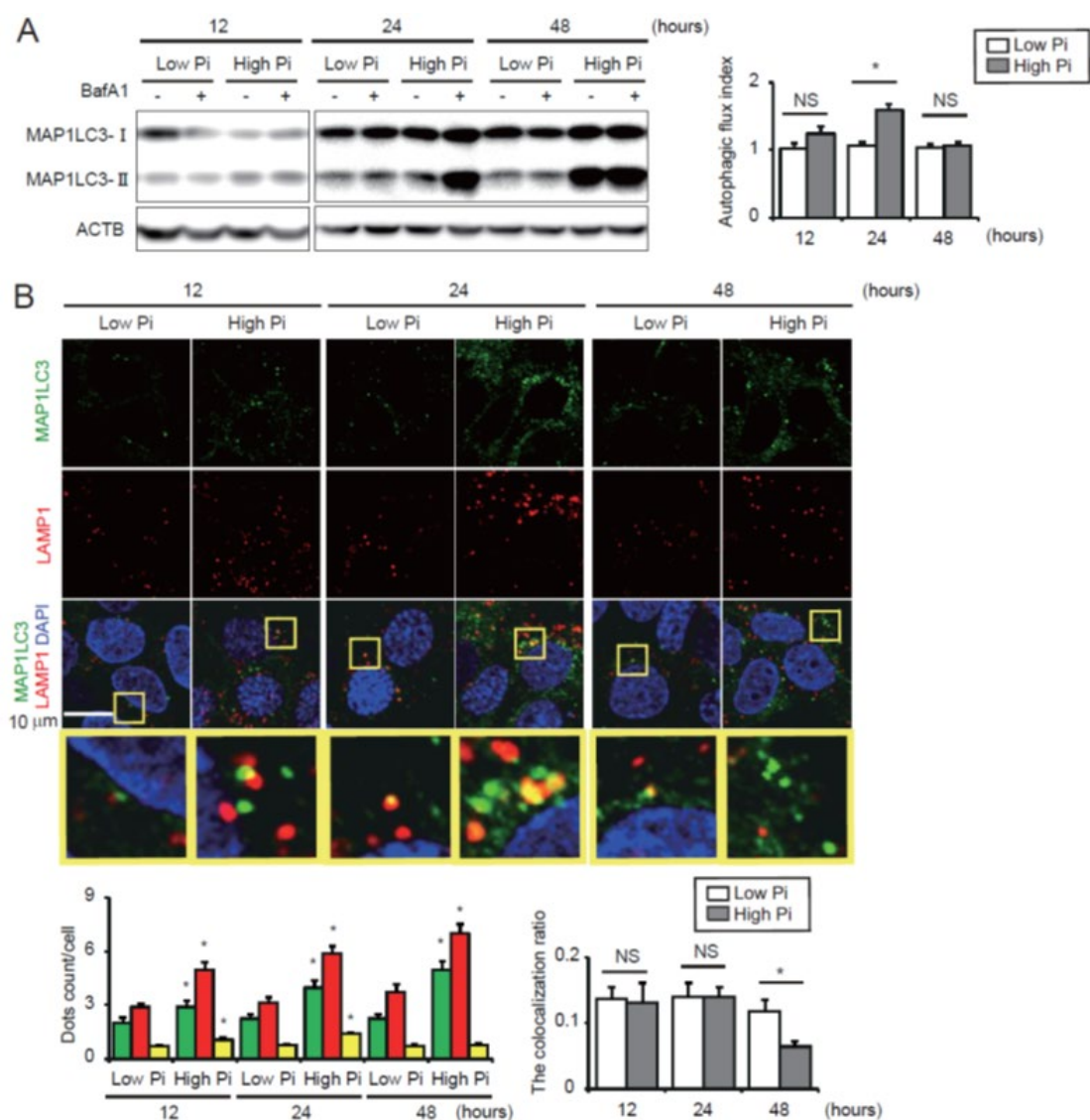


Fig. 1 高リン負荷によるオートファゴソームとリソソームの融合不全
 (A) 高リン負荷 24 時間ではオートファジーが亢進するが、48 時間ではオートファジーが停滞する。
 (B) 高リン負荷により、次第にオートファゴソームとリソソームの融合不全を生じる。

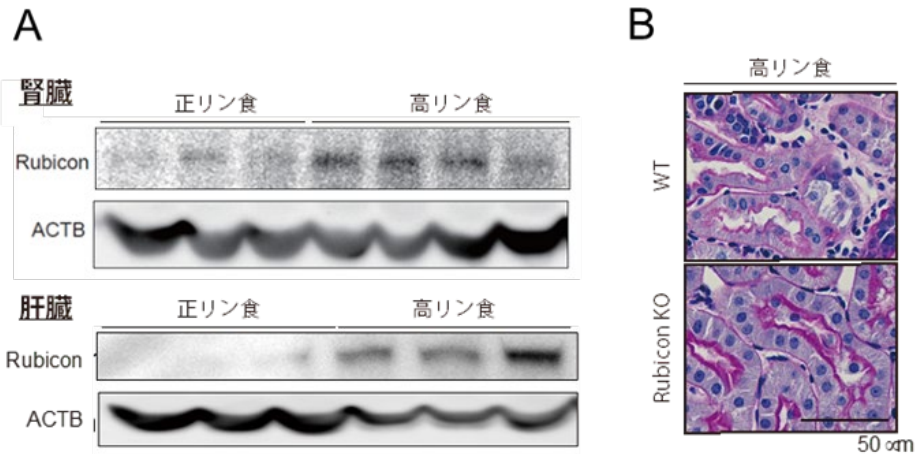


Fig. 2 高リン負荷による Rubicon の増加と Rubicon ノックアウトによる改善
 (A) 高リン負荷により腎臓・肝臓において Rubicon の蛋白発現が増加する。
 (B) 高リン負荷による腎障害は Rubicon 欠損により改善する。

3. 3 マグネシウムによる高リン毒性解除

低マグネシウム血症は、CKD 患者において最も頻度の高い電解質異常であり、進行した CKD 患者の約 15% に低マグネシウム血症が存在する、また尿蛋白による尿細管障害というありふれた病態自体が低マグネシウム血症のリスクとなり、腎障害進展に向かう悪循環に陥る⁽¹⁵⁾。さらに、低マグネシウム血症は CKD 患者の腎機能低下や透析患者の死亡リスク上昇と関連する^(3, 4)。

そこで、片腎摘野生型マウスに対して、正(リン=0.29%) or 高リン(リン=1.29%) × 低(マグネシウム=0.01%) or 正(マグネシウム=0.05%) or 高マグネシウム(マグネシウム=0.2%) 食を与え、腎機能・腎組織障害の評価を行った。まず、興味深いことに、電子顕微鏡観察にて、高リン低マグネシウム食負荷マウスの尿細管管腔内や細胞内に CPP 様物質が観察

された。さらに、高リン低マグネシウム食は Rubicon を著増させ、オートファゴソームとリソソームの融合不全からオートファゴソーム・p62・ユビキチンの蓄積を起こした。リソソームの数・機能は亢進していた。

その結果、ミトコンドリア傷害・脂質代謝障害・炎症細胞浸潤・細胞老化といった高リン腎毒性が増悪するのに対して、マグネシウムを充足させるとこれらのオートファジー障害と腎尿細管障害・炎症所見が改善した(**Fig. 3**)。このマグネシウムによる腎保護効果は近位尿細管特異的オートファジー不全(*Atg5* ノックアウト)マウスでは減弱した。マグネシウムの充足により、増加した Rubicon が適切なレベルにまで抑制され、高リン毒性が解除された可能性が推測された(**Fig. 4**)。

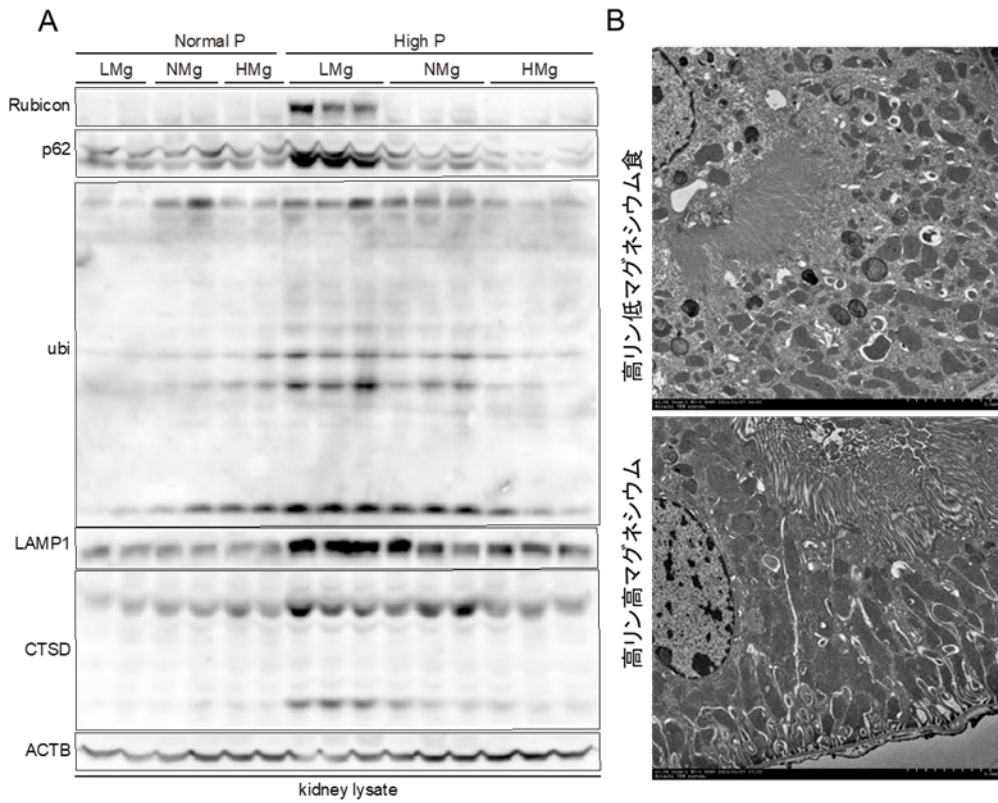


Fig. 3 マグネシウム充足は、高リン負荷による腎オートファジー不全を軽減する

- (A) 高リン低マグネシウム食は、腎における Rubicon を著増させ、オートファゴソームとリソソームの融合不全からオートファゴソーム・p62・ユビキチンの蓄積を起こす。
 (B) 高リン低マグネシウム食による融合不全はマグネシウム補充により改善する。

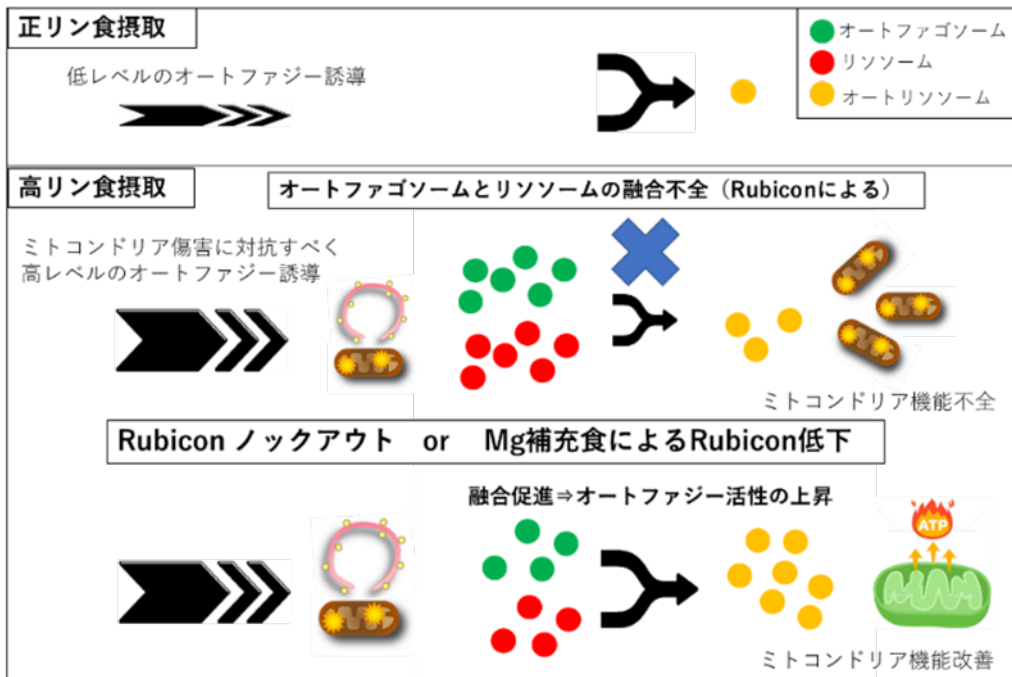


Fig. 4 マグネシウムは Rubicon 抑制を介したオートファジー活性化により高リン毒性を軽減する

4. 考察

本研究では、①高リン負荷は、特に腎臓で **Rubicon** を増加させ、オートファジー後期段階の障害をもたらすこと、② **Rubicon** 抑制は高リン負荷による腎障害を予防すること、③低マグネシウム食は高リン毒性を増悪させるが、その充足によって腎保護につながることを見出した (**Fig. 4**)。

今後、さらなる詳細な検討、および他の研究グループからの報告も待たねばならないが、本研究で得られた知見は、CKD のみならず、高リン毒性がもたらす老化促進を抑制する、アンチエイジングに対する波及効果があり、今後さらなる高齢社会を迎えるわが国において社会へのインパクトは極めて大きいものと考えられる。

これまでオートファジーを扱った多くの基礎研究では、人工的にオートファジー (オートファゴソーム形成の前期段階) を不全にしたマウス (**Atg5** ノックアウト) が使用され、酵母から哺乳類におけるオートファジーの重要な役割が証明されてきたが、筆者らの検討により、老化や高脂肪食負荷肥満・糖毒性により、さらにヒト肥満患者でも、特にオートファジー後期段階の不具合によりオートファジー調節不全 (病態に対抗するために必要な活性が不十分である状態) が生じ、病理病態に寄与していることが判明した。つまりこれまでのオートファジー研究の成果は、空想上のもではなく人々の健康・実臨床に深く関係することを証明してきた^(6, 7, 10)。吉森保教授は、オートファジーの負の制御因子 **Rubicon** を世界で初めて同定し⁽¹⁴⁾、加齢に伴い全身の種々の臓器で **Rubicon** が増加すること、**Rubicon** を抑制するとオートファジーが活発化し加齢に伴う老化現象の改善と寿命延伸が見られることを報告した⁽¹²⁾。さらに今回 **Rubicon** ノックアウトが高リン負荷マウスの腎障害改善にも寄与することが判明した。高リン負荷による **Rubicon** 増加の詳細な機序や臓器による違いを、現在検討中である。

現在、オートファジーやマイトファジーを亢進させる薬剤の探索・開発が世界的に進められている。筆者は、オートファジーを本来体に備わっている生体恒常性維持機構と捉え、人々の食生活や運動を通じてオートファジー活性調節を行うことこそが健康長寿の秘訣と考えている。その観点から、最近、オートファジー障害を解除する食品成分を探索し、特に魚食に多く含まれるエイコサペンタエン酸 (EPA) がオートファジーを回復し腎脂肪毒性を軽減することを見出した⁽¹⁰⁾。そして、マグネシウムもまた伝統的な日本

食やにがりに豊富に含まれる。対照的に、現在わが国でも広く流通している加工食品・ファストフード・コンビニ食などでは、食品添加物に用いられる無機リンの消化管吸収率が極めて高くほぼすべて吸収されてしまう一方、精製過程で大半のマグネシウムが失われてしまう、すなわち高リン低マグネシウム食である。実際、厚生労働省『国民栄養調査』によるとマグネシウム推定摂取量の平均値 (男性、50-59 歳) は 2002 年から 2019 年の間に 299 mg から 265 mg へ減少し、推奨量である 370 mg を大きく下回っている。このように、リン毒性を増強させる典型的な食事が現代社会に広く流布しており、今後改めて、マグネシウムの有効性の確立・提唱を推進していきたい。

本研究では、『マグネシウム摂取による腎不全進行抑制の機序』の一端を明らかにすることができたが、今後、さらにオートファジー研究が進展し、高リン毒性の本態とマグネシウムによるリン毒性軽減の機序が解明され、CKD 患者の予後改善、超高齢化社会における健康長寿に寄与することが望まれる。なお、本研究の一部は、『マグネシウムは **Rubicon** 抑制を介したオートファジー活性化により高リン腎毒性を軽減する』“Magnesium attenuates phosphate-induced kidney injury by inhibiting **Rubicon** and restoring autophagic activity.”として、第 64 回日本腎臓学会学術総会および第 11 回分子腎臓フォーラムで発表し、現在論文準備中である。本研究の計画立案・実施にあたっては、大阪大学大学院腎臓内科学の高畠義嗣講師/猪阪善隆教授に多くのご指導をいただいた。マグネシウム研究では大阪大学大学院腎疾患臓器連関制御学の坂口悠介助教、オートファジー・**Rubicon** 研究では大阪大学大学院遺伝学吉森保教授より、それぞれご助言・ご指導をいただいた。この場を借りて深く感謝申し上げます。

5. 文献

1. Hall KD, et al. Ultra-Processed Diets Cause Excess Calorie Intake and Weight Gain: An Inpatient Randomized Controlled Trial of Ad Libitum Food Intake. *Cell Metab.* 2019;30(1):67-77 e63.
2. Rico-Campa A, et al. Association between consumption of ultra-processed foods and all cause mortality: SUN prospective cohort study. *BMJ.* 2019;365:l1949.
3. Sakaguchi Y, et al. Low magnesium diet aggravates phosphate-induced kidney injury. *Nephrol Dial*

- Transplant. 2019;34(8):1310-1319.
4. Sakaguchi Y, et al. Magnesium modifies the association between serum phosphate and the risk of progression to end-stage kidney disease in patients with non-diabetic chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2015;88(4):833-842.
 5. Mizushima N, Levine B. Autophagy in Human Diseases. *N Engl J Med.* 2020;383(16):1564-1576.
 6. Yamamoto T, et al. Time-dependent dysregulation of autophagy: Implications in aging and mitochondrial homeostasis in the kidney proximal tubule. *Autophagy.* 2016;12(5):801-813.
 7. Yamamoto T, et al. High-Fat Diet-Induced Lysosomal Dysfunction and Impaired Autophagic Flux Contribute to Lipotoxicity in the Kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(5):1534-1551.
 8. Takabatake Y, et al. Stagnation of autophagy: A novel mechanism of renal lipotoxicity. *Autophagy.* 2017;13(4):775-776.
 9. Sakai S, et al. Proximal Tubule Autophagy Differs in Type 1 and 2 Diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 2019;30(6):929-945.
 10. Yamamoto T, et al. Eicosapentaenoic acid attenuates renal lipotoxicity by restoring autophagic flux. *Autophagy.* 2021;17(7):1700-1713.
 11. Matsuda J, et al. Metabolic effects of RUBCN/Rubicon deficiency in kidney proximal tubular epithelial cells. *Autophagy.* 2020:1-16.
 12. Nakamura S, et al. Suppression of autophagic activity by Rubicon is a signature of aging. *Nat Commun.* 2019;10(1):847.
 13. Fujimura R, et al. Autophagy protects kidney from phosphate-induced mitochondrial injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;524(3):636-642.
 14. Matsunaga K, et al. Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol.* 2009;11(4):385-396.
 15. Oka T, et al. Proteinuria-associated renal magnesium wasting leads to hypomagnesemia: a common electrolyte abnormality in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2019;34(7):1154-1162.

Magnesium Attenuates Phosphate-Induced Kidney Injury by Inhibiting Rubicon and Restoring Autophagic Activity

Takeshi Yamamoto

Department of Nephrology, Osaka University Graduate School of Medicine

Summary

With the aging of the population and the increase in lifestyle-related diseases, the number of patients with chronic kidney disease (CKD) and dialysis is increasing. Thus, there is an urgent need for medical and social measures to address this problem. Hyperphosphatemia accelerates vascular calcification and its health hazards have long been a problem in CKD patients. It has been reported that a high phosphate diet increases phosphate excretion from the renal tubules, resulting in the formation of fine calcium-phosphate crystals, calciprotein particles (CPP), in the renal tubules, which can damage the tubules. Epidemiological studies have shown that magnesium intake reduces the risk of CKD and heart disease, but the underlying mechanisms are not clear.

Autophagy is the main degradation mechanism in the cell and plays a role in maintaining cellular homeostasis. We have studied the effects of lifestyle-related diseases such as aging, obesity, and diabetes, on autophagy in kidney proximal tubules and found that autophagy protects against the phosphate-induced kidney injury via mitochondrial quality control, although high phosphate impairs autophagy, which diminishes its protective effect.

Based on the background information, we hypothesized that magnesium can attenuate the high phosphate toxicity by inhibiting the CPP formation and restoring the autophagic activity. Main findings are as follows;

1) high phosphate load gradually causes fusion failure of autophagosomes and lysosomes, 2) high phosphate load increases expression of Rubicon in the kidney, 3) phosphate-induced kidney injury is ameliorated by Rubicon deficiency, and 4) a high-phosphate/low-magnesium diet markedly increases Rubicon in the kidneys and causes autophagy failure, which is ameliorated by magnesium supplementation. In conclusion, in this study, we found that magnesium attenuates phosphate-induced kidney injury by inhibiting Rubicon and restoring autophagic activity.